

# VU Research Portal

## Mass Spectrometry-Based Biochemical Assays for the Screening of Enzyme Inhibitors

de Boer, A.R.

2007

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

de Boer, A. R. (2007). *Mass Spectrometry-Based Biochemical Assays for the Screening of Enzyme Inhibitors*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## Samenvatting

'Drug discovery' is de eerste fase in de ontwikkeling van nieuwe medicijnen. In deze fase is het zoeken naar remmers voor farmacologisch relevante enzymen vaak een belangrijke start. Voor het zoeken naar remmers wordt een enzym dat pathogeen is of waarvan de activiteit geassocieerd is met een ziekte, geselecteerd als 'drug target'. Enzymen zijn een belangrijke klasse van drug targets omdat ze meer dan 25% van alle drug targets vertegenwoordigen.

Na het selecteren van de drug target worden grote sets van verbindingen gescreend op activiteit tegen deze 'drug target'. Het uiteindelijke doel hiervan is om verbindingen te vinden die het enzym farmacologisch gezien beïnvloeden. De hierbij gebruikte analyses zijn vooral gebaseerd op UV detectie, radioactiviteit en fluorescentie detectie, maar de laatste jaren wordt ook massaspectrometrie (MS) toegepast.

Het gebruik van MS voor het zoeken naar nieuwe remmers heeft grote voordelen. Het belangrijkste voordeel is dat de MS-analyses, in tegenstelling tot analyses die gebaseerd zijn op UV, fluorescentie en radioactiviteit, niet gebaseerd zijn op gelabelde verbindingen maar op de massa-ladingverhouding ( $m/z$ ). Omdat MS-analyses niet beperkt worden door de noodzaak gelabelde verbindingen te ontwikkelen en synthetiseren, zijn ze veel flexibeler. Daarnaast is het met MS mogelijk om gelijktijdig meerdere verbindingen te analyseren die betrokken zijn bij het enzymassay. Label-gebaseerde technieken hebben deze mogelijkheid niet. In het geval van het screenen van enzymremmers kunnen substraat, product(en), co-factoren, co-enzymen worden gedetecteerd en gebruikt worden voor het bepalen van de enzymatische activiteit. Ook kan de moleculaire massa van de remmer worden gedetecteerd, en kunnen accurate massametingen samen met fragmentatie-experimenten (MS/MS) leiden tot de identificatie van de remmer. Problemen met valse positieven en valse negatieven die vaak optreden bij op fluorescentie gebaseerde assays komen in het algemeen niet voor wanneer electrospray ionisatie (ESI)-MS wordt gebruikt. Een belangrijke vereiste voor de toepassing van ESI-MS is het gebruik van vluchtige buffers en oplosmiddelen om verontreiniging van de ionisatiebron, de formatie van adducten en ionisatieonderdrukking te voorkomen.

**Hoofdstuk 2** beschrijft verscheidene MS-gebaseerde methoden voor het zoeken naar enzymremmers. De methoden zijn ingedeeld in twee categorieën op basis van het detectieprincipe: directe analysemethoden en indirecte analysemethoden. Directe analysemethoden detecteren de actieve verbindingen (remmers) als enzym-remmer-complex of na dissociatie van het enzym-remmercomplex. Deze analysemethoden vereisen de scheiding van ongebonden en gebonden verbindingen om onderscheid te kunnen maken tussen actieve en niet-actieve verbindingen. Indirecte analysemethoden maken gebruik van reporterverbindingen voor de detectie van actieve verbindingen.

In **Hoofdstuk 3** wordt de detectie van peptidofosforylering door het enzym cAMP-dependent proteïne kinase A (PKA) systematisch geoptimaliseerd met behulp van ESI-MS. Hierbij wordt de labelvrije detectie van gefosforyleerde peptiden door ESI-MS gedemonstreerd. Het substraat, het gefosforyleerde product en de interne standaarden werden gedetecteerd en hun ratio's werden gebruikt voor het bepalen van de enzym-

activiteit. De compatibiliteit van enzymassays en ESI-MS krijgen veel aandacht in dit hoofdstuk. Belangrijke factoren die de activiteit van het enzym en de gevoeligheid van de massaspectrometer beïnvloeden werden onderzocht, zoals co-factoren, co-enzymen, substraatconcentratie, pH, bufferzout (concentratie) en methanol concentratie. Daarnaast werden PKA remmers geanalyseerd en werden  $K_i$  waarden verkregen. De  $K_i$  waarden zijn in overeenstemming met data van labelgebaseerde methoden.

**Hoofdstuk 4** beschrijft het on-line 'continuous-flow'-systeem gekoppeld aan ESI-MS dat gebruikt werd voor het screenen van cathepsin B-remmers. In het systeem werden de reagentia voor een enzymassay continu toegevoegd en gemixt met het HPLC effluent. De uitgang van het systeem was gekoppeld aan de massaspectrometer om de enzymatische hydrolyseproducten te detecteren. Deze producten werden gebruikt als reporterverbindingen voor de mate van enzymactiviteit. Remmers die gescheiden werden door HPLC, remden cathepsin B in de continuous-flow enzymassay, wat een afname van de concentratie reporterverbinding tot gevolg had. Enzymremmers werden gedetecteerd door een afname in de concentratie van de enzymatische producten in de massachromatogrammen. Het gebruik van ESI-MS leverde gelijktijdig chemische (MS, MS/MS) en biologische informatie (enzymremming) op van verbindingen die elueerden van de HPLC kolom. De moleculaire massa's van de remmers werden met hoge zekerheid bepaald door het vergelijken van de retentietijd en de piekvorm. Omdat dit met hoge nauwkeurigheid kan, was basislijnscheiding van co-eluerende verbindingen niet nodig voor identificatie van de moleculaire massa's. Systeemmonitoringsverbindingen werden aan de reagentia toegevoegd om de systeemprestaties te monitoren. Het continuous-flowsysteem werd toegepast voor het screenen van complexe monsters, zoals plantenextracten. Detectielimieten van 0,3-0,8  $\mu\text{mol/L}$  remmer werden verkregen voor het screenen van een rode klaverextract. De prestaties van het op ESI-MS gebaseerde screeningssysteem komen nauw overeen met data ( $\text{IC}_{50}$  waarden) verkregen door fluorescentie gebaseerde methoden.

In **Hoofdstuk 5** wordt de ontwikkeling en toepassing van een 'continuous-flow' screeningssysteem op microchipniveau beschreven. De ontwikkelde microchip bevatte twee microreactors van 1,6 en 2,4  $\mu\text{L}$  met kanaaldimensies van  $70 \times 125 \mu\text{m}$ , waar respectievelijk de enzymremming en substraatconversie plaats vond. Het microchipsysteem werd gekoppeld aan de HPLC zodat het screenen van mengsels mogelijk werd. Om de detectielimieten te verbeteren werden de monsters geconcentreerd met behulp van on-line vaste fase extractie. De twee microreactors leverden 32 en 36 sec reactietijd, wat voldoende was voor het screenen van enzymremmers. De totale snelheid van het eluens was 4  $\mu\text{L/min}$ , wat 25 keer minder verbruik van reagentia betekende in vergelijking met het systeem wat beschreven is in Hoofdstuk 4. De detectielimieten zijn vergelijkbaar met het systemen gebaseerd op fluorescentiedetectie, terwijl de gevoeligheid, bandverbreding, stabiliteit en het analyseren van enzymremmers vergelijkbaar zijn met macrosystemen.

In **Hoofdstuk 6** is de potentie van de combinatie hoge-temperatuur vloeistof chromatografie (HTLC) met ESI-MS gebaseerde continuous-flow-enzymassays voor

het screenen naar cathepsin B remmers onderzocht. Er wordt gedemonstreerd dat HTLC bij hoge temperaturen (tot 208°C) resulteerde in een verlaagde polariteit van de mobiele fase. De HTLC scheiding van remmers werd isotherm of met behulp van een temperatuurgradiënt uitgevoerd. De hoeveelheid methanol die nodig was voor de scheiding was een stuk lager (10%) dan de hoeveelheid die nodig was voor conventionele HPLC (80%). Deze lage hoeveelheid verbeterde de compatibiliteit van HPLC met een biochemisch assay aanzienlijk. De mobiele fase was voor de scheiding voldoende verwarmd omdat goede piekvormen werden verkregen, terwijl het koelen na de kolom voorkwam dat het enzym gedeactiveerd werd. De gevoeligheid is vergelijkbaar met het systeem dat beschreven is in Hoofdstuk 4. De hoge temperaturen die gebruikt werden voor HTLC resulteerden niet in thermische ontleding van de remmers. De resultaten geven duidelijk de compatibiliteit van HTLC met een enzymassay aan.

**Hoofdstuk 7** beschrijft een continuous-flowsysteem dat ESI-MS gebruikt voor het meten van interacties tussen liganden en de receptoren streptavidin en anti-digoxigenin. De actieve liganden aanwezig in het monster concurreerden met de reporterligand voor de actieve plaats van de receptor. Twee reporterliganden, biotin and digoxin, werden gebruikt om de interacties te monitoren. Een toename in de intensiteit van een reporterligand betekende de binding van een ligand aan de reporter. De resultaten die met dit MS gebaseerde systeem verkregen zijn, zijn in overeenstemming met resultaten verkregen met een fluorescentie gebaseerd systeem.